

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 22 日 (22.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/087249 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 9/00, 9/02, 11/00, G01N 33/15, 33/50, C12N 15/09, A01K 67/027
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/004301
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 11 日 (11.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-069835 2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004) JP
特願2004-094065 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人 久留米大学 (KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 星野 友昭 (HOSHINO, Tomoaki) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 久留米大学医学部内 Fukuoka (JP). 相澤 久道 (AIZAWA, Hisamichi) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 久留米大学医学部内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 木島 智子 (KIJIMA, Tomoko); 〒5770002 大阪府東大阪市稲田上町 1-3-2 8-4 0 3 智 特許事務所 Osaka (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROTEASE INHIBITOR AND PREVENTIVES OR REMEDIES FOR DISEASES

(54) 発明の名称: プロテアーゼ阻害剤及び疾患の予防又は治療剤

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a novel protease inhibitor and curative remedies and a therapeutic method for chronic obstructive pulmonary disease, immunodeficiency syndrome, alveolar proteinosis and circulatory diseases. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] A protease inhibitor and a preventive or a remedy for chronic obstructive pulmonary disease or immunodeficiency syndrome characterized by containing at least one member selected from among redox active proteins and genes encoding the same; and a preventive or a remedy for chronic obstructive pulmonary disease, alveolar proteinosis or circulatory diseases characterized by containing at least one member selected from IL-18 and a gene encoding the same.

(57) 要約: 【課題】新たなプロテアーゼ阻害剤、慢性閉塞性肺疾患・免疫不全症候群・肺胞蛋白症・循環器疾患の根治的治療薬及び治療法を提供すること。【解決手段】レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤、及び慢性閉塞性肺疾患又は免疫不全症候群の予防又は治療剤、並びに、IL-18又はこれをコードする遺伝子から選択される少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患・肺胞蛋白症・循環器疾患の予防又は治療剤である。



WO 2005/087249 A1

明 細 書

プロテアーゼ阻害剤及び疾患の予防又は治療剤 技術分野

- [0001] 本発明は、慢性閉塞性肺疾患の病因の一つと考えられるプロテアーゼの阻害剤、及び慢性閉塞性肺疾患、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療剤に関するものである。

背景技術

- [0002] 慢性閉塞性肺疾患Chronic Obstructive Pulmonary Disease: (以下、「COPD」と記載する。)とは、肺気腫、慢性気管支炎、あるいは両者の併存により、進行性の閉塞性換気障害を特徴とする疾患である。COPDにおける気流制限は、末梢気道病変における気道抵抗上昇と肺気腫による肺弾性収縮力低下に因り、2者の関与の程度は症例によって様々ではあるが、COPD患者の多くは肺気腫優位の傾向を示す。肺気腫の最大のリスクファクターが喫煙である事は多くの疫学的研究より明らかである。2001年に米国National Heart, Lung and Blood Institution (NHLBI)とWorld Health Organization (WHO)との共同で報告されたGlobal Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)にも述べてあるように、1990年の調査では世界でのCOPDの罹患率は、全人口に対し、男性で9.34/1000, また女性では7.33/1000となっており、罹患率が非常に高い疾患である。現時点でのCOPDによる呼吸不全が原因の死亡は、アメリカの死因の4位と推定されている。また、日本における厚生労働省の報告でもCOPDによる死亡率は、最近の30年間で約4倍に増加した。COPD治療薬として従来知られているのは、気管支拡張剤とステロイドもしくはこの組み合わせである。しかしながらあまり効果がなく、新規の治療薬が求められている。また、臭化チオトロピウム水和物も上市されているが、さらに有効な薬剤が求められている。
- [0003] このため、COPDの根治的治療薬及び治療法はいまのところ確立されていない。
- [0004] 非特許文献1:Pauwels, R. A., Buist, A. S., Calverley, P. M., Jenkins, C. R., and Hurd, S. S. “Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic

Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.”「American journal of respiratory and critical care medicine」, vol.163: PP.1256-1276, 2001.

非特許文献2:Barnes, P. J. “Novel approaches and targets for treatment of chronic obstructive pulmonary disease.”「American journal of respiratory and critical care medicine」, vol.160: S72-79, 1999.

- [0005] また、肺胞蛋白症とは肺胞腔内にサーファクタント蛋白とリン脂質が集積する原因不明の疾患である。近年、90%を占める特発例でGM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor : 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子) の活性を抑制する自己抗体の存在が示されたが、現在のところ根治的治療法がなく、気管支鏡下で肺胞を生理食塩水によって洗浄するぐらいしか治療法はない。
- [0006] そして、COPDを含む慢性肺疾患による右心負荷が原因となって起こる肺性心等の心不全や、それに続く肝不全、肺高血圧症等の循環不全等が、COPDに関連する循環器疾患として知られている。
- [0007] このため、COPD、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、心不全、肺高血圧症等)の根治的治療薬及び治療法が求められている。
- [0008] また、1980年代、エイズ(免疫不全症候群)に感染した患者のほとんどは死を免れなかった。HIV(ヒト免疫不全ウイルス)と呼ぶウイルスがCD4(抗原蛋白の一種で、分子量59kDaの単鎖膜貫通型d糖タンパク。)陽性細胞に感染し体の免疫系が破壊され、体力が弱って消耗し、死に至る。
- [0009] しかし、近年米国をはじめ先進各国では、HIV感染者の運命は劇的に様相が違ってきた。1996年7月にカナダのバンクーバーで開かれた国際エイズ会議では、関係者に希望を抱かせる発表が相次いだ。例えばニューヨークにあるアーロン・ダイヤモンド・エイズ研究センターのホー(David Ho)は、プロテアーゼ阻害剤とすでに1991年以降に市場に出回るようになっていたAZT(ジドブジン、逆転写酵素阻害剤の一種)タイプの抗ウイルス剤とを組み合わせたカクテル療法(人体内でHIVが増えるのを邪魔する薬を複数使用して、AIDSの発症を押さえる方法)によって、非常に優れた結果が得られたと報告した。また、カクテル療法の中でも、HAART療法(高活性抗レトロウイルス療法)等が注目されている。

- [0010] このカクテル療法は、根本治療にはならないものの、エイズ患者の免疫細胞を増やすだけでなく、血液中のウイルス数を検出限界以下にまで減らしたことが報告された。
- [0011] AZT、d4T(スタブジン、逆転写酵素阻害剤の一種)、ddI(ジダノシン、逆転写酵素阻害剤の一種)のような以前からの逆転写酵素阻害剤薬と一緒に服用すると、これらのプロテアーゼ阻害剤は最も有効に働くことが知られている(いわゆる抗HIV療法(highly active antiretroviral therapy)HAART療法)。事実、1996年から1998年の間に、米国ではHIV感染に伴う死者が70%以上も減り、エイズは死因の上位10位から外れた。エイズの死亡率は統計がとられるようになった1987年以降、1998年に最低となり、更に低下する見通しである。
- [0012] 1995年12月、米食品医薬品局(FDA)は最初のプロテアーゼ阻害剤「サキナビル」を認可した。1996年春までには、さらに2つの阻害剤「リトナビル」と「インジナビル」が認可された。しかしながら、HIVプロテアーゼ阻害剤は、阻害作用は優れているものの副作用が多いという欠点を有している。
- [0013] ところで、HIV患者の血清中にチオレドキシシンが著明に発現している(Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2688-93)ことが分かっているが、今のところその意義は明らかになっていない。
- [0014] 一方、エラスターゼは、肺を構成する弾性線維(elastic fiber)の主成分である不溶性タンパク質エラスチンを加水分解するプロテアーゼとして知られている。このエラスターゼは、気管内へ投与することによって、COPDの一種である肺気腫を誘導することが古くから知られており、エラスターゼ投与動物が、肺気腫の動物モデルとして用いられている。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0015] 我々は、上記の通り、エラスターゼが肺気腫を引き起こすことに鑑み、エラスターゼ等に代表されるプロテアーゼの阻害が、COPDの一種である肺気腫の治療に役立つのではないかという仮説に基づき、プロテアーゼ阻害剤を探索し、また得られたプロテアーゼ阻害剤であるレドックス活性蛋白質が、実際にCOPDを強力に抑制することや

、免疫不全症候群の治療の為に、単独であるいはHAART療法等のカクテル療法に用いられるプロテアーゼ阻害剤として使用できる可能性を見出し、更に、レドックス活性蛋白質が、ある種のIL-18阻害活性を有していることから、他のIL-18阻害剤のCOPD治療薬への可能性に思い至り、本発明を完成するに至ったものであって、その目的とするところは、エラスターゼを含むプロテアーゼの阻害剤、引いてはCOPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、心不全や肝不全あるいは肺高血圧症を伴う循環不全等の循環器疾患の根治的治療薬及び治療法を提供するにある。

課題を解決するための手段

[0016] 上述の目的は、[1]下記(1)乃至(4)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤、[2]プロテアーゼがメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼから選択されるものである、当該プロテアーゼ阻害剤、[3]下記(1)乃至(4)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患又は免疫不全症候群の予防又は治療剤、[4]下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤、[5]下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、肺胞蛋白症の予防又は患治療剤、[6]下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、循環器疾患の予防又は治療剤によって達成される。

[0017] (1)レドックス活性蛋白質

(2)レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質

(3) (1)をコードする遺伝子

(4) (2)をコードする遺伝子

(5)インターロイキン18阻害剤

(6)インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

(7) (1)をコードする遺伝子

(8) (2)をコードする遺伝子

発明の効果

- [0018] 本発明のレドックス活性蛋白質又はその遺伝子を含むプロテアーゼ阻害剤、及び COPDの予防又は治療剤は、COPDを強力に抑制することができる他、免疫不全症候群の治療の為に、単独であるいはHAART療法等のカクテル療法に用いられるプロテアーゼとして使用可能である。レドックス活性蛋白質又はその遺伝子は、もともと生物細胞中に存在するものであるため、従来免疫不全症候群のカクテル療法に用いられているプロテアーゼ阻害剤のような副作用が無いという利点を有している。また本発明のIL-18阻害剤又はその遺伝子を含む疾患の予防又は治療剤は、COPD、肺胞蛋白症、心不全や肝不全あるいは肺高血圧症等を伴う循環不全等の循環器疾患を、効果的に治療することができる。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1]実施例2の第1群(controlマウス)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)
- [図2]実施例2の第2群(病態マウスモデル1)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)
- [図3]実施例2の第3群(病態マウスモデル2)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)
- [図4]実施例2の第4群(病因+治療剤投与マウス)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)
- [図5]実施例2の第1〜4群のマウスの、平均の肺胞の長さ(mean linear intercept: Lm)を表す図である。
- [図6]実施例3のSPC-IL-18TGマウスに、PBSを投与した群(コントロール)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)
- [図7]実施例3のSPC-IL-18TGマウスに、TRXを投与した群の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)。
- [図8]参考例1の、健常人肺の肺組織における、IL-18の発現量を示す、免疫組織染

色の結果を示す図である(免疫染色, ×400倍)。

[図9]参考例1の、COPD患者の肺組織における、IL-18の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である(免疫組織染色, ×40倍)。

[図10]参考例1の、COPD患者の肺組織における、IL-18の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である(免疫組織染色, ×200倍)。

[図11]参考例2の、健常人の肺組織における、TRXの発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である(免疫組織染色, ×40倍)。

[図12]参考例2の、健常人の肺組織における、TRXの発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である(免疫組織染色, ×200倍)。

[図13]参考例2の、COPD患者の肺組織における、TRXの発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である(免疫組織染色, ×40倍)。

[図14]参考例2の、COPD患者の肺組織における、TRXの発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である(免疫組織染色, ×200倍)。

[図15]シグナルペプチドを持つ成熟IL-18cDNAのシークエンス(DNA配列)である。

[図16]本発明で用いられる組換え遺伝子SPC-IL-18SPである。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 〈プロテアーゼ〉

プロテアーゼとは、蛋白質分解酵素のことであるが、例えば、メタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ(酸性プロテアーゼ)等が挙げられる。

[0021] メタロプロテアーゼとは、亜鉛などの重金属を活性中心に持つタンパク質分解酵素であり、マトリックス・メタロプロテアーゼ(以下、「MMP」と記載する。)やサーモリシン等が挙げられる。

MMPとは、動物細胞の細胞間の接着性マトリックス・タンパク質を加水分解し、細胞分裂や形態形成、さらにはガン転移に関与している亜鉛含有プロテアーゼである。

MMPとしては、MMP-1, 2, ... 28等30種類近くが同定されている。

[0022] システインプロテアーゼとは、システイン残基を活性中心に持つプロテアーゼであり、カスパー、ゼ、パpain(papain)等が挙げられる。カスパーゼとしては、カスパーゼ-1

, 2, 3...等20種類近くが挙げられるが、中でもカスパーゼ-1、-3や-9が、本発明のプロテアーゼ阻害剤のターゲットとして重要である。

[0023] カスパーゼは、アスパラギン酸のC末端側を切断するが、不活性型前駆体として存在し、アポトーシスのシグナルにより切断されて活性型になるものである。具体的には、カスパーゼ-1等が挙げられ、これはインターロイキン1 β 変換酵素とも呼ばれ、IL-18前駆体を切断し、活性型のIL-18とすることも知られている。

[0024] セリンプロテアーゼとしては、エラスターゼの他、キモトリプシン(chymotrypsin)やスブチリシン(subtilisin)等が挙げられる。

[0025] エラスターゼとは、肺を構成する弾性線維(elastic fiber)の主成分である不溶性タンパク質エラスチンを加水分解するプロテアーゼとして知られている。

[0026] アスパラギン酸プロテアーゼとしては、ペプシン(pepsin)やカテプシンD(cathepsin D)等が挙げられる。

[0027] 〈本発明のプロテアーゼ阻害剤、及びCOPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、肺性心等の心不全や肺高血圧症)等の循環器疾患の予防又は治療剤〉

[0028] (レドックス活性蛋白質)

本発明のプロテアーゼ阻害剤、及びCOPD又は免疫不全症候群の予防又は治療剤の有効成分として用いられるものとしては、下記(1)乃至(4)単独の他、これらの組み合わせ等が挙げられる。

(1)レドックス活性蛋白質

(2)レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質

(3) (1)をコードする遺伝子

(4) (2)をコードする遺伝子

[0029] レドックス活性蛋白質と同等の活性とは、下記に示す、レドックス制御活性を言う。

[0030] レドックス活性蛋白質とは、レドックス(酸化と還元, reduction-oxidation)の両方の活性を有することによって、レドックス制御(酸化還元状態を調節すること)のできる蛋白

質であり、レドックス活性ペプチド等をも含むものである。例えば、チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド類や、HO-1 (ヘムオキシゲナーゼ-1) 等が挙げられる。

- [0031] チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド類とは、チオレドキシン(以下「TRX」と記載する。)ファミリーに属するポリペプチド類(以下、「TRX-P」と記載する。)とは、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を有するポリペプチド類であって、もともと、生物細胞中に存在するポリペプチド類である(特開2002-179588等参照)。
- [0032] 本発明で言う「TRX-P」には、天然のヒトを含む動物、植物、大腸菌、酵母からの抽出ポリペプチド類以外に、遺伝子組み換えにより酵母や大腸菌等から抽出されるポリペプチド類、化学合成で作成されるポリペプチド類等も含まれる。但し、ヒト由来のもの、及びそれを大腸菌、酵母において遺伝子組み換えで作成したもの、及びそれらと同一又は類似の配列からなる合成ペプチドが、生体を与える影響がより少ないと考えられるため好ましい。
- [0033] TRX-Pは、システイン残基を含む活性部位(-Cys-X1-X2-Cys-:X1, X2は、アミノ酸残基を表し、同一であっても異なるものでも良い。)を有し、類似の3次元構造を持つ分子群である。従って、本発明で言う「TRX-P」には、上記の他、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を損なわない範囲で、一部のアミノ酸が欠失又は置換されたものや、他のアミノ酸、ペプチドが融合されたものであっても良い。
- [0034] 活性部位の具体例としては、-Cys-Gly-Pro-Cys-, -Cys-Pro-Tyr-Cys-, -Cys-Pro-His-Cys-, -Cys-Pro-Pro-Cys-等が挙げられるが、中でも、-Cys-Gly-Pro-Cys-が、種を超えて保存されている配列であるため、マウスモデルによる実験結果の人間への応用がより確実であるという理由で好ましい。
- [0035] 「TRX-P」には、具体的には、例えば、活性部位が-Cys-Gly-Pro-Cys-であるチオレドキシン(TRX)、グルタレドキシン等が挙げられる。
- [0036] TRXには、ヒト、大腸菌、酵母由来のものがあり、グルタレドキシンには、ヒト、大腸菌由来のものがある。
- [0037] ヒト細胞から「TRX-P」を抽出する具体的な方法としては、以下の方法が例示される。
- 。

(A) ヒト由来の細胞株から抽出する方法 (特開平1-85097号公報等参照)。

(B) 遺伝子組み換え法を用いる方法 (特開平1-85097号公報等参照)。

(C) ペプチド合成法を用いる (特開平5-139992号公報等参照)。

[0038] (IL-18阻害剤)

本発明のCOPD, 肺胞蛋白症, 循環器疾患の予防又は治療剤の有効成分として用いられるものとしては、下記(5)乃至(8)単独の他、これらの組み合わせ等が挙げられる。

(5) インターロイキン18阻害剤

(6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

(7) (1)をコードする遺伝子

(8) (2)をコードする遺伝子

[0039] 本発明のIL-18阻害剤としては、IL-1 β 変換酵素阻害剤を含むシステインプロテアーゼ阻害剤等の、IL-18前駆体から活性型IL-18への変換を阻害する物質、IL-18結合蛋白質(IL-18 binding protein (IL-18BP)グループ等)や抗IL-18抗体等の、IL-18の活性を中和する物質、リコンビナント型(The Combination of Soluble IL-18R α and IL-18R β Chains Inhibits IL-18-Induced IFN- γ (Journal of Interferon and cytokine research 22:P.593-601, 2002, Mary and Liebert, Inc.))又は天然型の可溶性IL-18レセプター(WO2005/12352)等のIL-18受容体へのIL-18の結合を阻害する物質、IL-18受容体結合後のシグナル伝達の阻害剤等、又はこれらをコードする遺伝子等が挙げられる。

[0040] IL-1 β 変換酵素阻害剤(ICE)としては、種々の化合物が知られている。IL-1 β 前駆体中の、ICEと親和性を有する部位に類似するペプチド類等が挙げられ、例えば、IL-1 β 前駆体切断部位のAsp116からN末端側へかけての4アミノ酸からなるペプチド(Tyr-Val-Ala-Asp)配列を有するペプチド類が、ICEのIL-1 β 前駆体への結合を阻害するとして知られている(特開許平11-147895号公報, [0002]の[従来技術]参照)。また、具体例として、例えば、特開平5-255218号公報に記載のペプチド誘

導体、特開平11-147873号公報に記載のスルホンアミド誘導体、特表平10-504285号公報に記載のペプチド誘導体、特開平11-147895号公報に記載のグリシン誘導体および国際出願WO97/24339号公報に記載のテトラゾール誘導体等が挙げられる。

- [0041] IL-18結合蛋白質(IL-18BP)とは、[Immunity,10,127-136(1999)]に記載された蛋白質及びそのサブクラス、すなわち当該文献のP.136末尾に記載されたGenBank accession number AF110798で表される遺伝子がコードするIL-18結合蛋白質またはそのサブクラスを意味する。サブクラスとしては、例えば当該文献記載のGenBank accession number AF110799, AF110800, AF110801, AF110802, AF110803, AF110460等で表される遺伝子がコードする蛋白質が挙げられる。これらは、文献[Immunity,10,127-136(1999)]に記載の方法に準じて調製することができる。
- [0042] IL-18に特異的なモノクローナル抗体は、文献[J.Immunol.Methods,217,97-102(1998)]に記載の方法に準じて調製することができる。
- [0043] IL-18受容体へのIL-18の結合を阻害する物質の具体例としては、例えば、IL-18受容体蛋白質およびIL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体等を挙げることができる。IL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体としては、Kitasato, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kato, S., Koda, Y., Nagata, N., Kinoshita, M., Koga, H., Yoon, D. Y., Asao, H., Ohmoto, H., Koga, T., Rikimaru, T., and Aizawa, H. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol, 31: 619-625, 2004. に報告してあるようにH44モノクローナル抗体(Human IL-18R(α chain)に対する抗体)等が挙げられる。
- [0044] 上記IL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、哺乳動物由来の抗体、キメラ抗体又は擬人化抗体のいずれであっても良い。
- [0045] 本発明に用いられるIL-18受容体蛋白質およびIL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、例えば、特開平11-100400号公報に記載の方法に準じて調製することができる。
- [0046] IL-18受容体結合後のシグナル伝達の阻害剤としては、Myd88, IRAK(IL-1receptor-associated kinase), TRAF6(TNF receptor-associated Factor), TAK-

1 (TGF- β activated kinase), MAPKK3,4,6 (MAP kinase kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38, NIK (NF- κ B-inducing kinase), IKK (I κ B-kinase), 等の IL-18 のシグナル伝達分子を、阻害する物質が挙げられ、例えば p38MAPキナーゼ阻害剤である SB203580, SB220025, RWJ 67657 (American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine vol.160 pp S72-S79, 1999), NF- κ B 阻害剤である、I- κ B inhibitor, I- κ B α gene transfer (American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine vol.160 pp S72-S79, 1999) や PS-341 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.95 PP.15671-15676, December 1998 Medical Sciences) 等が挙げられる。

- [0047] 尚、本発明で用いられる IL-18 阻害剤としては、上記の IL-18 阻害剤そのものの他、IL-18 阻害剤がポリペプチドの場合には、それをコードする遺伝子の他、IL-18 阻害剤のアミノ酸配列のうち、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ IL-18 阻害活性を有するタンパク質、あるいは、これらをコードする遺伝子も含まれる。
- [0048] 本発明の COPD の予防又は治療剤の有効成分としては、上記の レドックス 活性蛋白質に関連する物質 ((1) 乃至 (4)) と IL-18 阻害剤に関連する物質 ((5) - (8)) を、組み合わせて用いることもできる。
- [0049] 本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤中の、有効成分の含有量は、剤形によって様々であり、一概に限定できず、各種剤形化が可能な範囲で、投与量との関係で適宜選択すれば良いが、例えば液剤の場合、0.0001-10 (w/v%)、好ましくは 0.001-5 (w/v%)、特に注射剤の場合、0.0002-0.2 (w/v%)、好ましくは 0.001-0.1 (w/v%)、固形剤の場合、0.01-50 (w/w%)、好ましくは 0.02-20 (w/w%) 等として調製できるが、必ずしもこの範囲に限定されるものではない。
- [0050] 本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤の投与量は、投与経路、症状、年齢、体重、予防又は治療剤の形態等によって異なるが、例えば、プロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤中の有効成分の量が、処置を必要としている対象体重 1kg 当たり 0.005-500mg、好ましくは、0.1-100mg、但し、成人に対して 1

日あたり、下限として0.01mg(好ましくは0.1mg)、上限として、20g(好ましくは2000mg、より好ましくは500mg、更に好ましくは100mg)となるように、1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

[0051] 本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤は、従来知られている本発明の目的とする疾患の予防又は治療成分との合剤としても良い。その予防又は治療成分としては、以下の1. -5. 等が挙げられる。

[0052] 1. メディエーターアンタゴニスト:

例えば、LTB₄ antagonists (例えばLY29311, SC-53228, CP-105,696, SB201146, BIIL284)、5'-Lipoxygenase inhibitors (例えばzileutin, Bayx1005)、Chemokine inhibitors、IL-8 antagonists (例えばSB225002; CXCR2 antagonists)、TNF inhibitors (例えばmonoclonal Ab, soluble receptors, MMP inhibitors)、Antioxydants (例えばNAC, NAL, グルタチオン, スーパーオキシドジスムターゼ等)、Prostanoid inhibitors (例えばCOX-2 inhibitors, thromboxane antagonists, isoprostane receptor antagonists)、iNOS inhibitor 等

[0053] 2. 抗炎症剤:

例えば、Phosphodiesterase 4 inhibitors (例えばSB207499, CP80633, CDP-840)、Adhesion inhibitors (例えばanti-CD11/CD18, anti-ICAM1, E-selectin inhibitors)、Prostaglandin E analogs (例えばmisoprostil, butaprost)、サイトカイン(例えばIL-10)、Colchicine、Macrolide antibiotics (例えばerythromycin, clarithromycin, roxithromycin)等

[0054] 3. プロテアーゼインヒビター:

例えば、Neutrophil elastase inhibitors (例えばICI200355, ONO-5046, MR-889, L658,758)、Cathepsin inhibitors (例えばsuramin)、Matrix metalloprotease inhibitors (例えばbatimastat, marimastat, KBR7785)、alpha1-antitrypsin (例えばpurified, human recombinant, gene transfer)、Secretory leukoprotease inhibitor、Elafin等

[0055] 4. Immunoregulators:

例えば免疫抑制剤FK506等

[0056] 5. 呼吸器炎症疾患又は呼吸器過敏症治療剤:

テオフィリン等のキサンチン誘導体、 β 2受容体刺激剤、抗コリン剤、抗アレルギー用剤、副腎皮質ホルモン剤及び吸入ステロイド等のステロイド剤等。

- [0057] また、本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤には、その阻害効果や予防又は治療効果を阻害しない範囲で、他の成分を含有させることができ、例えば薬学的に許容される担体として、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、乳化剤、可溶化剤、吸収促進剤、保湿剤、吸着剤、充填剤、増量剤、付湿剤、防腐剤等の添加剤を用いて周知の方法で製剤化することができる。
- [0058] ここに、賦形剤としては、有機系賦形剤及び無機系賦形剤等が挙げられる。
- [0059] 本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤は、主に経口投与するためのものであるが、具体的には、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ、もしくはシロップ剤等の形態で、経口投与される。
- [0060] 投与形態としては、経口投与のほか、静注等の静脈投与、筋肉内投与、経皮投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、直腸内投与、粘膜投与、吸入等が挙げられるが、静注等の静脈投与が安全かつ血中濃度を一定に保つという点で好ましい。
- [0061] 尚、上述のレドックス活性蛋白質をコードする遺伝子を、遺伝子療法における、プロテアーゼ阻害剤やCOPD又は免疫不全症候群の予防・治療剤として用いることもできる。また、IL-18阻害剤がポリペプチドの場合には、IL-18阻害剤をコードする遺伝子を、遺伝子療法における、COPD、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防・治療剤として用いることもできる。
- [0062] その際の遺伝子形態としては、DNAの他、RNA、プラスミド、ウイルスベクター等が使用可能であり、一本鎖であっても二本鎖であっても良い。
- [0063] プラスミドを用いる場合、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。
- [0064] ウイルスベクターを用いる場合、(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの

引用文献等)等に記載されているように、ウイルスに、目的とする遺伝子を組み込むことによって行うことができる。

[0065] ウイルスベクターに用いるウイルスとしては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスが挙げられる。

ウイルスの中では、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等が好ましく、特にアデノウイルスが好ましい。

[0066] 遺伝子を実際に医薬として作用させるには、当該遺伝子を直接体内に導入する「in vivo法」の他、ヒトから採集した細胞に当該遺伝子を導入し、その後、遺伝子導入細胞を体内に戻すという、「ex vivo法」等がある[日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊, 12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等]が、in vivo法がより好ましい。

[0067] 「in vivo法」により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択することができる。投与経路としては、例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等が挙げられる。

[0068] 「in vivo法」によって投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である遺伝子を含む注射剤等の形態が好ましく、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。

[0069] また、遺伝子を含むリポソームまたは膜融合リポソーム(センダイウイルス(HVJ)ーリポソーム等)においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態として用いることができる。

[0070] 〈本発明の阻害剤や予防又は治療剤を用いた、プロテアーゼ阻害方法、及びCOPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療方法〉

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPD又は免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療剤を、上記のような様々な形態で投与すること、あるいは、本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療剤である遺伝子を、遺伝子治療によって用いることによって、予防又は治療することができる。

[0071] 〈本発明の効果確認に用いる疾患動物モデルの作製方法〉

[伝統的COPD動物モデル]

本発明において、COPD抑制効果の確認のために用いる肺気腫動物モデルは、文献記載の方法を用いることができるが(Shapiro, S. D. Animal models for COPD. Chest, 117: 223S-227S, 2000)、具体的には、例えば清潔PBSに懸濁した豚エラストーゼを、シリンジで気管内投与すること等によって作製することができる。

[新規疾患動物モデル]

本発明において、COPD抑制効果の確認のために用いる疾患動物モデルとしては、本発明者(星野, 特願2004-069835)によって開発された、新たなCOPD動物モデルも用いることができる。この動物モデルは、COPDの他、肺胞蛋白症や循環器疾患の動物モデルとしても使用可能であるが、下記の説明においては、便宜上、COPD動物モデルと記載することがある。その作製方法を以下に記載する。

[0073] ここで用いられるCOPD動物モデルとは、肺特異的に発現するプロモーターの制御下にある下記(X1)乃至(Y2)のいずれかの遺伝子を含むことを特徴とする組換え遺伝子を導入した動物モデルである。

(X1)インターロイキン-18遺伝子

(X2)インターロイキン-18のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(Y1)カスパーゼ-1遺伝子

(Y2)カスパーゼ-1のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつカスパーゼ-1と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[0074] この動物モデルを用いることによって、生後約5から8週間という短期間で、COPDや肺気腫等の慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症等の肺疾患、循環不全(肝不全、肺性心等の心不全、肺高血圧症)等の循環器疾患等の循環器疾患を発症することが確認されている。これによって、従来、起炎物となるタバコの繰り返し投与のために6ヶ月に亘る長期間を要していた動物モデル作製期間が短縮され、しかもブタエラストー

ゼやパパイン等も含めて起炎物の投与を一切行わないで簡便に行うことができる。

[0075] 〈組換遺伝子〉

この動物モデルに導入する組換遺伝子は、下記(X1)又は(X2)遺伝子(以下、併せて「IL-18遺伝子類」と記載することがある。), あるいは下記(Y1)又は(Y2)遺伝子(以下、併せて「カスパーゼ1遺伝子類」と記載することがある。)を、肺特異的に発現するプロモーターの制御下に置くことによって、得ることができる。肺特異的に発現するプロモーターとしては、肺構成細胞由来プロモーター等が挙げられ、例えば肺サーファクタントプロモーター又はクララ細胞プロモーター等が挙げられる。

[0076] (X1)IL-18遺伝子

(X2)IL-18のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつIL-18と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(Y1)カスパーゼ-1遺伝子

(Y2)カスパーゼ-1のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつカスパーゼ-1と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[0077] IL-18と同等の活性とは、IL-18レセプターを通じたシグナル伝達等を意味し、例えばインターフェロン γ (IFN- γ)を誘導する活性等を意味する。また、カスパーゼ-1と同等の活性とは、IL-18前駆体(プロIL-18, proIL-18)を切断して、活性型(成熟型IL-18, matureIL-18)とする活性を意味する。

[0078] 肺サーファクタントプロモーターとしては、ヒト肺サーファクタントプロモーター(surfactant protein-C遺伝子プロモーター。以下、「SPCプロモーター」と記載する。)等が挙げられる。SPCプロモーターは、例えばEarly restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7.に記載された手法に準じて得ることができる。

[0079] クララ細胞プロモーターとしては、CC10プロモーター(CCSPと言うことがある。)等が挙げられる。CC10プロモーターは、例えばcis-acting elements that confer lung epithelial cell expression of the CC10 gene. J Biol Chem. 1992 Jul

25;267(21):14703-12.に記載された手法に準じて得ることができる。

[0080] これらのプロモーターを用いることで、本発明の疾患動物モデルを効率良く作成することができる。

[0081] 組換遺伝子は、このほか、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためのシグナルペプチド(SP)遺伝子や、コザック配列等のタンパク発現を最適化する作用を持つ配列、発現遺伝子の釣り出し等に有用なポリA配列等を含んでいることが好ましい。

[0082] シグナルペプチドとは、タンパク質が細胞外に分泌される際、その疎水性により脂質で出来た細胞膜を通過するのに役立つアミノ酸配列であり、膜を通過した後、シグナルペプチダーゼと言う酵素で切断されるものである。

シグナルペプチドとしては、例えばマウスの免疫グロブリン(以下「Ig」と記載する。) κ -チェーン・シグナルペプチド等が挙げられる。

マウスのIg κ -チェーン・シグナルペプチドは、例えば、Carroll, W. L., E. Mendel, S. Levy. 1985. Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript. Mol. Immunol. 25:991.等に記載されている。

[0083] コザック配列とは、遺伝子のATG開始コドンの周辺で見つかった、細菌由来の、グアニン-シトシンを多く含むDNA配列で、タンパク発現を最適化する作用をもち、クローニングの際に用いられている配列である。

例えば、Nucleic Acids Res. 1984 Jan 25;12(2):857-72. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. に記載されている。

[0084] ポリA配列とは、遺伝子中のヌクレオチド配列で、アデニル酸(A)が連続している部分を言う。

ポリA配列としては、牛由来のポリA配列等が挙げられる。例えば、Goldman, L. A., E. C. Cutrone, S. V. Kotenko, C. D. Krause, J. A. Langer. 1996. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. BioTechniques 21:1013.等に記載されている。

[0085] また、組換遺伝子が(X1)又は(X2)等のIL-18遺伝子類を用いたものである場合には、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためには、シグナルペプチド遺伝子の

導入のほか、proIL-18を活性型IL-18に変換するIL-1 β 変換酵素(カスパーゼ-1)遺伝子を、IL-18遺伝子類とともに動物モデルに導入し、共に発現させる方法等、他の公知の技術を用いることもできる。

[0086] 〈疾患動物モデル〉

疾患動物モデルは、例えば次のような方法で、作成することができる。

[0087] 本発明に使用される動物としては、げっ歯類動物、イヌ、ネコ、サル、ウマ、ブタ等が挙げられ、このうち、げっ歯類動物としてはマウス、ラット等が挙げられるが、マウスが好ましく、マウスは、例えば、C57BL/6Nマウス(B6マウスとも言う)、Balb/cマウス等が好ましく用いられ、中でも、B6マウスが好ましい。

[0088] 以下本発明の説明においては、おもに、導入動物がマウスの場合を例に挙げて説明することがあるが、本発明は、マウスに関するものに限定されるものではない。

[0089] 上記を含む組換え遺伝子の作出方法としては、遺伝子組み換えの公知の方法を用いることができるが、例示すると、以下の通りである。尚、以下では主にIL-18遺伝子によって説明するが、上記(X2)のIL-18関連遺伝子や、上記(Y1)、(Y2)のカスパーゼ1遺伝子類の場合も同様に行うことができる。

[0090] マウスIg κ -チェーンの、V-J2-C領域から取り出したシグナルペプチド(文献(1)Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K. Cutting edge: IL-18-transgenic mice: in vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. J Immunol 2001;166:7014-7018／文献(2)Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imaizumi T, Aizawa H, Yoshino K. Exacerbated and Prolonged Allergic and Non-Allergic Inflammatory Cutaneous Reaction in Mice with Targeted Interleukin-18 Expression in the Skin. J Invest Dermatol 2003;121:502-509)と、マウスのpro-IL-18cDNA(上記文献(1)参照)を用い、シグナルペプチドを持つ成熟IL-18cDNAを、PCR法によって取得する(上記文献(1)、(2)参照)。pro-IL-18cDNAは、活性型(mature IL-18)になった際に、上記(X)又は(Y)遺伝子となるものであれば良い。

[0091] シークエンス(DNA配列)を図15及び配列1に例示する。図15(配列1)の配列中、7

ー9番目にある開始コドン「ATG」の直後の、10番目の配列Gから、69番目の配列Cまでが、マウスIg κ 鎖のV-J2-C領域由来シグナルペプチド遺伝子、その直後の「AAC」コドンから541ー543番目の「TAG」STOPコドンの直前の「AGT」コドンまでが、マウスの成熟IL-18cDNAである。

- [0092] 尚、開始コドンの前の、「GGA ACA」は、元々マウスのpro-IL-18cDNAのゲノムにあった、コザック配列を含む、タンパク発現を最適化する配列領域である。
- [0093] また、STOPコドンの後の「GTG」は、元々マウスのpro-IL-18cDNAのゲノムにあった配列であるが、特に必要ではないと考えられる。
- [0094] 次に、pCR2.1ベクター (Invitrogen製)を用いてPCR産物をクローニングし、シークエンスする(上記文献(1), (2)参照)。続いてヒトサーファクタントのプロモーターSPC(Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7.)、SV40 small T intron(Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7.)と牛由来ポリA(Goldman, L. A., E. C. Cutrone, S. V. Kotenko, C. D. Krause, J. A. Langer. 1996. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. BioTechniques 21:1013.)を含む3.7SPC/SV40ベクター (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, August 6, 2002 vol. 99 no. 16 10482-10487)で、EcoRI[New England Biolabs (MA, USA)]で切り出してEcoRIサイトに組み込む方法によってサブクローニングし、SPC-IL-18SPとする(図16)。
- [0095] SPC-IL-18SPをNdeI[New England Biolabs (MA, USA)]とNotI[New England Biolabs (MA, USA)]の制限酵素部位で37℃、2時間以上で(New England Biolabs (MA, USA)のプロトコールに準ずる)切断することによって、直鎖状DNAフラグメントを得ることができる。
- [0096] 組換え遺伝子をマウスに導入する方法としては、公知の遺伝子導入方法を用いることができるが、例えば、マウスの受精卵に上述のようにして得られた組換え遺伝子(上述の直鎖状DNAフラグメント)をマイクロインジェクション法(注入時期:前核期受精卵,

注入箇所:雄生前核)にて注入し、代理母マウスの卵管に挿入して作製したSPC-IL-18TGマウス(founder)を得る。組換遺伝子注入の確認は、生まれたマウス(ファウンダー)の尾部等の組織からDNA assay kit [Qiagen, Germany]等を用いて、DNAを抽出し、PCRで確認できる。雄性の野生型のマウス(代理母と同系で無いもの)と掛け合わせ、その子孫(雌雄どちらでも可。F2, F3, ……を含む)のうち、IL-18を発現しているものを選別することで、組換遺伝子導入の作製を行うことができる。選別する方法としては、尾部等の組織のゲノムDNAを用いたPCR分析、血清中の成熟IL-18のELISA分析、肺や心臓、肝臓等における、成熟IL-18のウェスタンブロッティング分析等が挙げられる(上記文献(1), (2)参照)。

- [0097] 肺特異的に発現するプロモーターの制御下にあるIL-18遺伝子)の導入量は、マウスの種類や発症させたいタイミング、発症させたい程度等にて合わせて、適宜調節することができ、特に限定されるものではないが、一般的には、マウスの肺で1 ng/lung以上(50 ng/kg 体重), 10 ng/lung以下(500ng/kg体重)が適当と考えられる。
- [0098] 動物モデルにおけるIL-18発現が、例えばマウス血清中の成熟IL-18のELISA分析で1 ng/mL以上、10ng/mL以下となる程度に導入することが好ましい。導入量が多いほど、上記の標的とする肺疾患や循環器疾患の殆どが発症する傾向にある。本モデル動物においては、同時に様々な疾患が発症し得るが、例えば肺疾患と心疾患では、病巣が異なるので、スクリーニングに当たって、いずれの部位に効く薬かは、区別可能である。また、疾患部位が同じ病気の場合でも、それぞれ特徴となる病態が異なるため、いずれの疾患の薬剤候補となり得るかは個々の臓器を解析することで判断可能である。
- [0099] SPC-IL-18導入から発症までの時期は、特に限定されるものではないが、早ければ4週齢前後から発症し始め、5週齢前後で殆どが発症し、高齢になるほど強い症状が現れる傾向にある。早い段階では、発症する疾患の種類やその出方に差があるが、5から8週齢前後で、上記の肺疾患や循環器疾患の殆どが発症する傾向にある。
- [0100] 上記のようにして得られた疾患動物モデルは、慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症等の肺疾患や、肺性心等の心不全、肝不全、肺高血症等の循環不全を含む、循環器疾患動物モデルとして有用であり、この動物モデルを用いることによって、これら疾患の

予防又は治療剤のスクリーニングが可能となる。

実施例 1

[0101] [試験管レベルでのTRXによる、プロテアーゼ抑制確試験]

TRXによる、カスパーゼ-1, MMP-1, MMP-9の抑制効果を調べた。

アッセイ方法:

[0102] 〈カスパーゼ-1〉

Thornberry NA (Nature 356(30):768-775,1992)に準じて行った。つまりリコンビナントヒトカスパーゼ-1を用い基質は20 μ M Ac-YVAD-AMC、37°C3時間反応させAMC (7-amino-4-methylcoumarin) の蛍光量で2回定量した(MDS Pharma Services Japan, 京都に測定委託)。

[0103] 〈MMP-1,9〉

リコンビナントMMP-1 (ペプチド研究所,京都), リコンビナントMMP-9 (ペプチド研究所,京都)を用い基質は50 μ M P3163-v (ペプチド研究所,京都):MOCAC-Pro-Leu-Gly+Leu-Azpr(DNP)-Ala-Arg-NH₂、37°Cで2時間反応させ、蛍光量で2回定量した。

[0104] 〈試験結果〉

精製TRX 100 μ g/mLの存在下で、カスパーゼ-1は21%抑制された。また精製TRX 100 μ g/mLの存在下でMMP-1, MMP-9がそれぞれ47%、76%抑制された。このことから、TRXには、システインプロテアーゼやメタロプロテアーゼ等のプロテアーゼの抑制効果があることが確認された。

実施例 2

[0105] [伝統的動物モデルを用いた、TRXのCOPD抑制効果実験]

上述した、エラスターゼを用いた伝統的なCOPD動物モデルを使って、COPD治療剤の効果を確かめる実験を行った。8週齢C57BL/6Nマウスを下記1-4の各群について5匹ずつ用いた。

[0106] (第1群) DAY1に、清潔PBS 100 μ Lをシリンジで気管内投与した群(参考例: controlマウス)。

(第2群) DAY1に、清潔PBS 100 μ Lに懸濁した豚エラスターゼ(SIGMA社製、0.3U)

をシリンジで気管内投与した群(比較例1:病態マウスモデル1)。

(第3群) DAY0からDAY20まで隔日で、TRX投与のコントロールとして清潔PBS 100 μ Lに懸濁した卵白アルブミン(OVA, SIGMA社製、40 μ g)を腹腔内投与し、清潔PBS 100 μ Lに懸濁した豚エラスターゼ(SIGMA社製 カタログ番号E1250、0.3U)を、DAY1にシリンジで気管内投与した群(比較例2:病態マウスモデル2)。

(第4群) DAY0からDAY20まで隔日で、清潔PBS 100 μ Lに懸濁したヒトリコンビナントTRX(40 μ g)を腹腔内投与し、清潔PBS 100 μ Lに懸濁した豚エラスターゼ(SIGMA社製 カタログ番号E1250、0.3U)をDAY1にシリンジで気管内投与した群(実施例2:病因+治療剤投与マウス)。

[0107] すべてのマウスはDAY21で回収した。20%中和ホルマリンを気管支から15cmH₂O圧をかけてマウス肺を還流固定。肺パラフィン切片はHE染色した。顕微鏡画像は顕微鏡用デジタルカメラDXM1200(NIKON製)で取り込み、解析ソフトはACT-1(NIKON製)、Photoshop(Adobe社製)で用いた。具体的には各群からランダムに肺組織(スライド)を選ぶ。一匹のマウスの両肺から左右の上肺野、中肺野と下肺野の計6断面のHE染色スライドから各断面5視野の画像をACT-1で取り込む。Photoshop(Adobe社製)を用いて各視野で300マイクロメートルのグリッド(線)4つ引く。肺胞がこのグリッドを横切った数を数える。例えば3回横切ると平均の肺胞の長さ(mean linear intercept: Lm)は300マイクロメートル/3=100マイクロメートルである。一匹のマウスのLmを6断面x5視野x4グリッド(線)=120グリッド(線)から求め各群の平均及びWelchのt検定で統計解析を行った。

[0108] 組織学的に(第1群:controlマウス)には肺に有意な変化はなかった(図1)。

[0109] 一方、(第2群:病態マウスモデル1)には著明に肺胞腔が広がり、実験病理学的COPDが出来た(図2)。

[0110] また、(第3群:病態マウスモデル2)は、著明に肺胞腔が広がり、実験病理学的COPDが出来るが、第2群と差がなかった。つまりレドックス蛋白でないコントロール蛋白であるOVAの腹腔内投与ではCOPDの発症は抑制されないことが判明した(図3)。

[0111] (第4群:病因+治療剤投与マウス)では、肺に変化は少なく、TRXが実験病理学的

COPDを強力に抑制することが分かった(図4)。

- [0112] そこで、これらHE染色スライドを用いて画像解析を行い、Lmを求めたところ、第1群、第2群、第3群、第4群のLmの平均はそれぞれ31.7, 69.0, 82.0, 30.4マイクロメートルだった(図5)。
- [0113] Lmを計測すると、第4群(病因+治療剤投与マウス)は、第2群(病態マウスモデル1, $p=2.62 \times 10^{-24}$)、第3群(病態マウスモデル2, $p=4.00 \times 10^{-20}$)に比べ有意にCOPDを統計学的有意に抑制した。
- [0114] 一方、第4群(病因+治療剤投与マウス)は、第1群(controlマウス)に比べLmに有意差はなかった。
- [0115] 実験の結果、この系を用いてレドックス活性蛋白質であるTRXが、実験病理学的COPDを強力にかつ統計学的有意に抑制することが確認された。
- [0116] また、レドックス活性蛋白質が、エラスターゼによって誘導される肺気腫動物モデルを抑制することから、このレドックス活性蛋白質が、エラスターゼ阻害剤として機能していることが確認された。つまり、実施例1の結果と考え併せると、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子が、エラスターゼに代表されるセリンプロテアーゼやメタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ等のプロテアーゼを阻害する効果を有することは明らかである。

実施例 3

- [0117] [新規動物モデルを用いた、TRXの実験病理学的COPDモデル抑制効果実験]
上述した新規COPD動物モデルを使って、COPD治療剤の効果を確かめる実験を行った。
上述の様に作製した、7から8週齢のSPC-IL-18TGマウス(各群5匹)に、隔日で0.1mLの無菌のリン酸緩衝液(PBS)(コントロール)もしくは0.2mLに溶解したリコンビナントヒトTRX400 μ g/mL(つまり一匹あたり40 μ g)を腹くう内投与した。21日後にマウス肺を回収し、肺組織をHE染色した。
- [0118] 結果を図6, 7に示す。その結果、PBSを投与したコントロール(図6)では、実験病理学的COPDモデルが発症していたのに対し、TRX投与群(図7)では、COPDや肺胞蛋白症は見られず、またHE染色で肺動脈が肥厚していないことや肺に著明なうっ血

がないことからこのマウスの心臓は、心不全等の循環器疾患等の症状が改善したと判断される。

- [0119] 上記のマウスモデルは、肺特異的にIL-18を発生させることにより、疾患を発症させるものである。そして、TRXにはIL-18阻害作用が知られており、これらのことから、IL-18のシグナルを抑制すると、COPDを初めとする、上記のマウスモデルの呈する疾患の予防又は治療が可能となることは明らかである。つまり、抗IL-18抗体等の上述のIL-18抑制剤も、COPD、肺胞蛋白症、心不全や肝不全あるいは肺高血圧症を伴う循環不全等の循環器疾患等の治療剤となることが分かった。

参考例1

- [0120] [COPD患者の病変局所におけるIL-18の強発現]

COPD患者10人の外科手術で得た組織及び交通事故等で亡くなった人等の6人の肺組織をホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。抗ヒトIL-18抗体(clone8)で免疫組織染色を行った。

- [0121] 結果を、図8～10に示す。

「Kitasato, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kato, S., Koda, Y., Nagata, N., Kinoshita, M., Koga, H., Yoon, D. Y., Asao, H., Ohmoto, H., Koga, T., Rikimaru, T., and Aizawa, H. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31: 619-625, 2004.」に報告してあるように、健常人の肺にはほとんど発現していない(図8)。

- [0122] その一方、COPD患者の肺病変部には、IL-18が強く発現していた。特に浸潤炎症細胞、肺胞上皮に強く発現していることが確認された(図9, 10)。
このことは、肺でのIL-18の過剰発現が、COPDの病因であることを裏付けるものである。

参考例2

- [0123] [2.1 COPD患者の病変局所におけるTRXの強発現]

COPD患者10人の外科手術で得た組織及び交通事故等で亡くなった人等の6人の肺組織を、ホルマリン固定しパラフィン切片を作製した。抗ヒトTRX抗体(Serotec製)で免疫組織染色を行った。免疫組織染色は以下の論文の方法に従った。

Kitasato, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kato, S., Koda, Y., Nagata, N., Kinoshita, M., Koga, H., Yoon, D. Y., Asao, H., Ohmoto, H., Koga, T., Rikimaru, T., and Aizawa, H. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31: 619-625, 2004.

[0124] その結果を、図11～14に示す。健常者の肺胞上皮には、TRXは、弱くしか発現していなかった(図11, 12)。

これに対して、COPD患者の肺病変部には、TRXが強く発現していた。特に浸潤炎症細胞、肺胞上皮や気管支の繊維芽細胞に強く発現していることが確認された(図13, 14)。

[0125] 参考例1, 2の結果からも、COPDで過剰に発現するIL-18を抑制するために、生体がTRXを発現させている可能性が裏付けられ、上述のIL-18阻害剤もまたCOPDの予防又は治療剤で有用であることが裏付けられた。

産業上の利用可能性

[0126] 本発明のレドックス活性蛋白質又はその遺伝子を含むプロテアーゼ阻害剤、及びCOPDの予防又は治療剤は、COPDを強力に抑制すること、及び免疫不全症候群の治療の為に、単独であるいはHAART療法等のカクテル療法に用いられるプロテアーゼとして使用可能である。また本発明のIL-18阻害剤又はその遺伝子を含む疾患の予防又は治療剤は、COPD、肺胞蛋白症、心不全や肝不全又は肺高血圧症等を伴う循環不全等の循環器疾患を効果的に治療することができる。

請求の範囲

- [1] 下記(1)乃至(4)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤。
- (1) レドックス活性蛋白質
 - (2) レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質
 - (3) (1)をコードする遺伝子
 - (4) (2)をコードする遺伝子
- [2] プロテアーゼがメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼから選択されるものである、請求項1記載のプロテアーゼ阻害剤。
- [3] 下記(1)乃至(4)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患又は免疫不全症候群の予防又は治療剤。
- (1) レドックス活性蛋白質
 - (2) レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質
 - (3) (1)をコードする遺伝子
 - (4) (2)をコードする遺伝子
- [4] 下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。
- (5) インターロイキン18阻害剤
 - (6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質
 - (7) (1)をコードする遺伝子
 - (8) (2)をコードする遺伝子
- [5] 下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、肺胞

蛋白症の予防又は患治療剤。

(5) インターロイキン18阻害剤

(6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

(7) (1)をコードする遺伝子

(8) (2)をコードする遺伝子

[6] 下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、循環器疾患の予防又は治療剤。

(5) インターロイキン18阻害剤

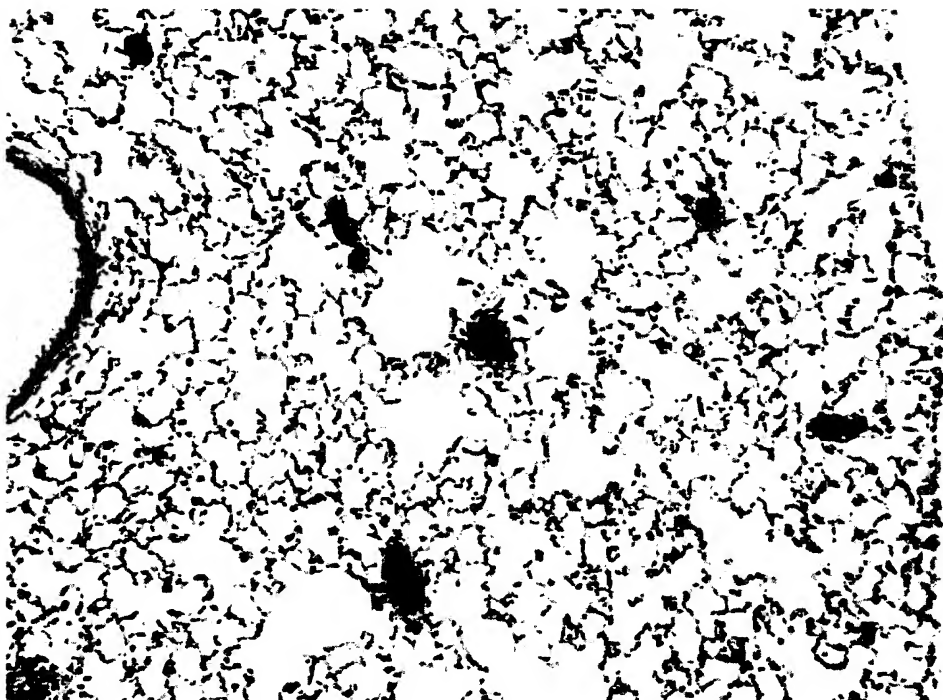
(6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

(7) (1)をコードする遺伝子

(8) (2)をコードする遺伝子

〔図1〕

HE染色，×40倍



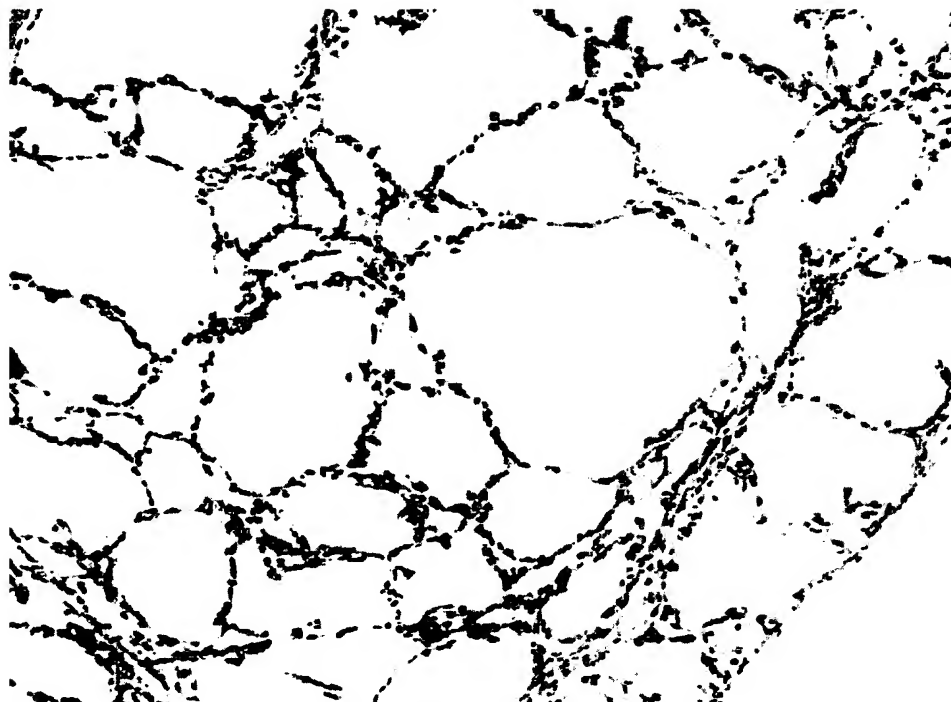
〔図2〕

HE染色，×40倍



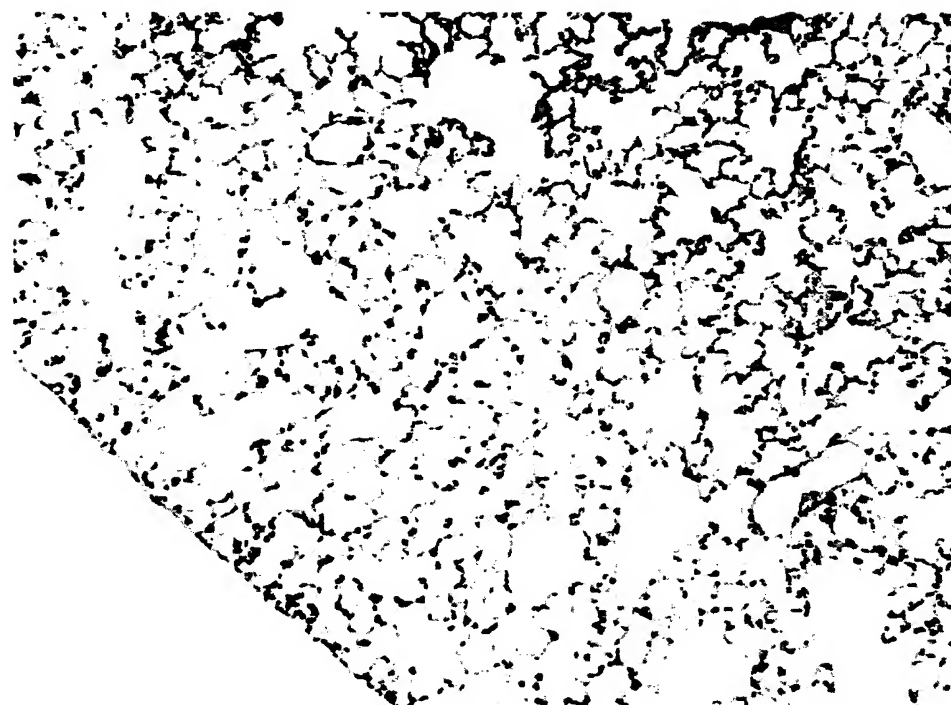
[図3]

HE染色，×40倍

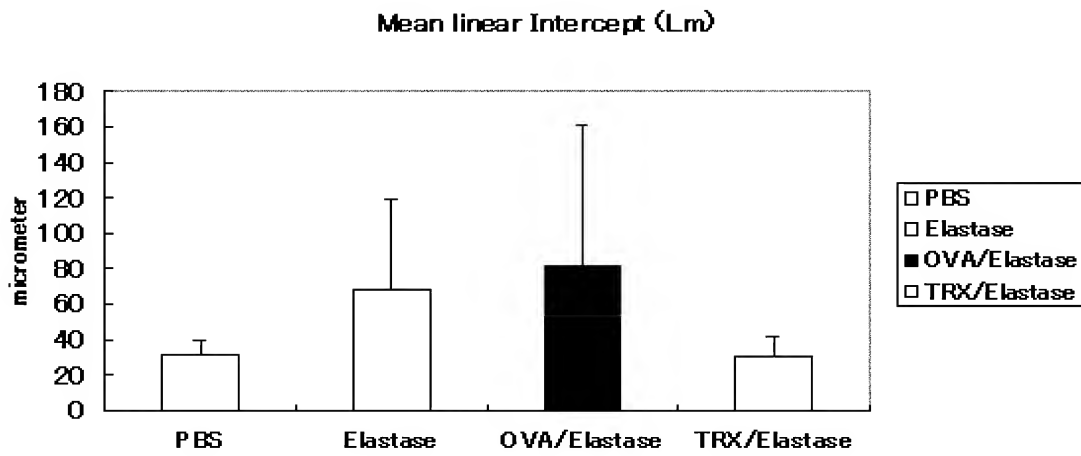


[図4]

HE染色，×40倍



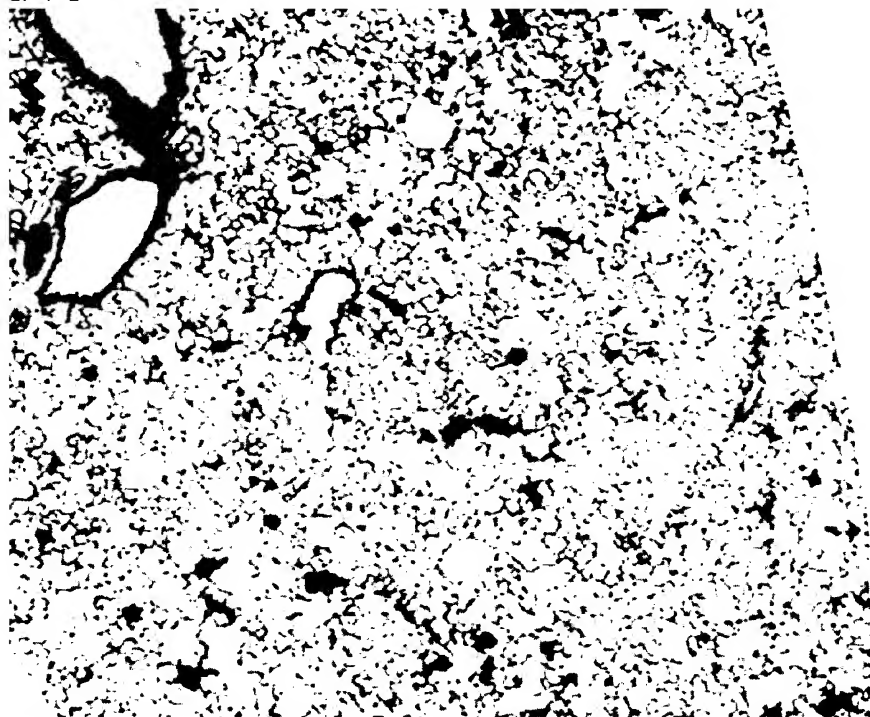
[図5]



[図6]



[[図7]]



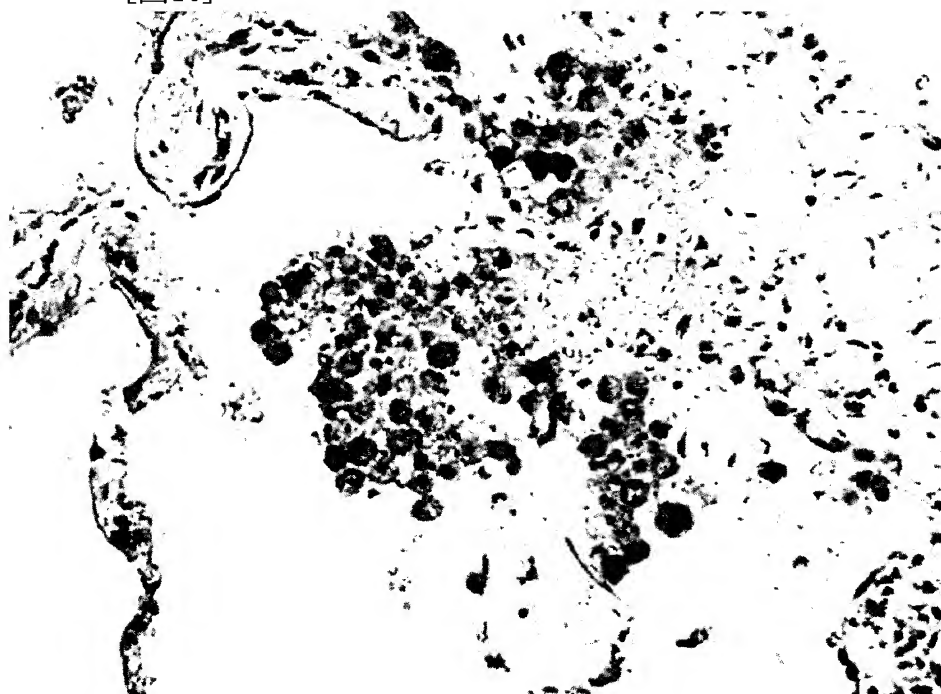
[[図8]]



[[図9]]



[[図10]]



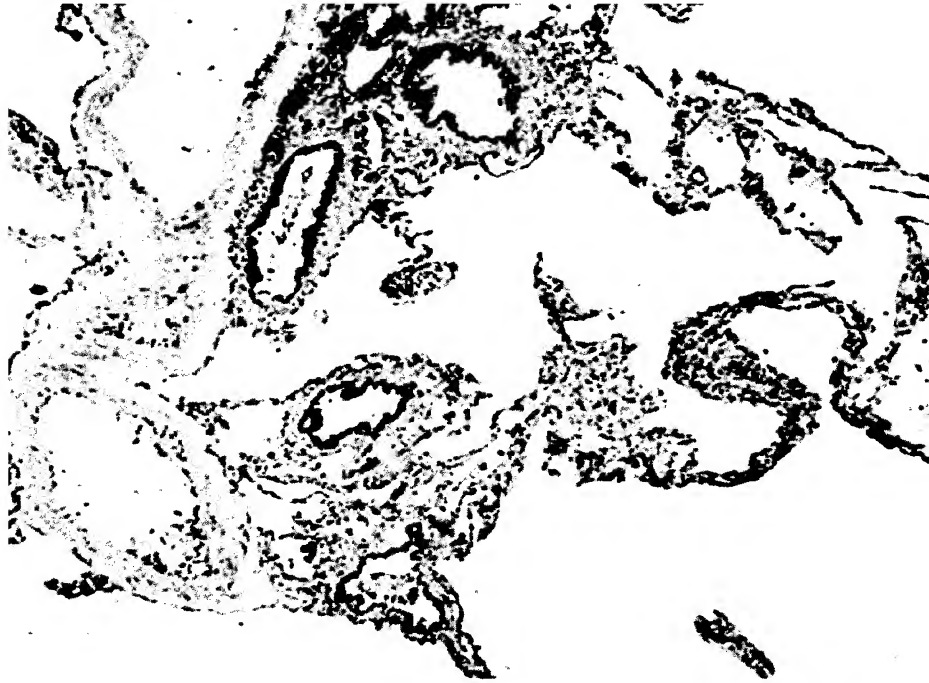
【図11】



【図12】



[[図13]]



[[図14]]

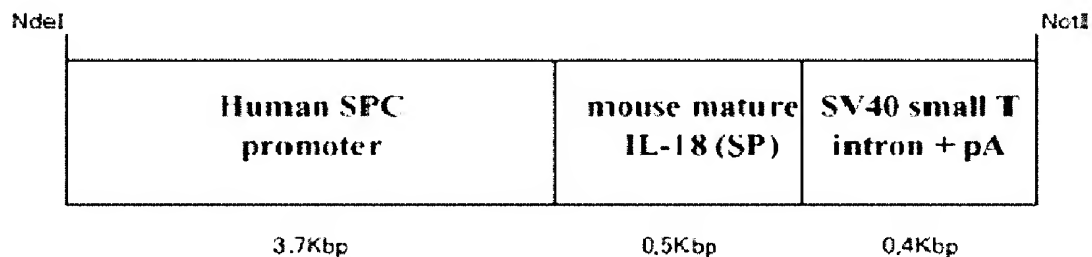


[図15]

シグナルペプチドを持つマウス成熟 IL-18c DNAの塩基配列 (transgene)

1	GGAAACAATGG AGACAGACAC ACTCCTGCTA TGGGTACTGC TGCTCTGGGT	50
51	TCCAGGTTCC ACTGGTGACA ACTTTGGCCG ACTTCACTGT ACAACCGCAG	100
101	TAATACGGAA TATAAATGAC CAAGTTCTCT TCGTTGACAA AAGACAGCCT	150
151	GTGTTGAGAG ATATGACTGA TATTGATCAA AGTGCCAGTG AAGCCGAGAC	200
201	CAGACTGATA ATATACATGT ACAAGACAG TGAAGTAAGA GGACTGGCTG	250
251	TGACCCCTCTC TGTGAAGGAT AGTAAATGT CTACCCCTCTC CTGTAAAGAC	300
301	AAGATCATTT CCTTGAGGA AATGGATCCA CCTGAAAATA TTGATGATAT	350
351	ACAAAGTGAT CTCATATTCT TTCAGAACG TGTTCAGGA CACACAAGA	400
401	TGGAGTTTGA ATCTTCACTG TATGAAGGAC ACTTTCTTGC TTGCCAAAG	450
451	GAAGATGATG CTTTCAAACCT CATTCTGAAA AAAAAGGATG AAAATGGGGA	500
501	TAAATCTGTA ATGTTCACTC TCACTAAGT ACATCAAAGT TAGGTG	546

[図16]

SPC-IL-18SP の構造図 (schematic design)

SP: signal peptide
pA: polyA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K38/00, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/02, 11/00, G01N33/15,
33/50, C12N15/09, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/00, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/02, 11/00, G01N33/15,
33/50, C12N15/09, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (SYN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UEDA, S. et al., Redox regulation of caspase-3 (-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c, J.Immunol., 1998, Vol.161, No.12, p.6689-95, full text	1, 2
X	FARINA, A.R. et al., Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion, Eur.J.Biochem., 2001, Vol.268, No.2, p.405-13, full text	1, 2
E, X	JP 2005-60408 A (Redokkusu BioScience Kabushiki Kaisha), 10 March, 2005 (10.03.05), Full text; particularly, Claims 1 to 40 (Family: none)	3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May, 2005 (16.05.05)

Date of mailing of the international search report

31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEN, C.K., Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants, Biochem.Pharmacol., 1998, Vol.55, No.11, p.1747-58, full text	3
Y	MACNEE, W. et al., Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease, Am.J.Respir.Crit.Care Med., 1999, Vol.160, No.5 Pt 2, p.S58-65, full text	3
Y	JP 2001-510997 A (KARO BIO AB), 07 August, 2001 (07.08.01), Full text; particularly, Claims 1 to 40 & WO 98/32863 A2	3
Y	JP 63-230637 A (Repligen Corp.), 27 September, 1988 (27.09.88), Full text; particularly, Claims 1 to 18 & EP 237189 A2	3
X	POMERANTZ, B.J. et al., Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2001, Vol.98, No.5, p.2871-6, full text	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004301

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004301

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention according to claim 1 of the present application relates to "a protease inhibitor characterized by containing - - - redox active proteins", while the inventions according to claims 4 to 6 relate to a remedy for CODP, alveolar proteinosis or circulatory diseases characterized by containing - - - an interleukin 18 inhibitor, i.e., being identical neither in active ingredient nor in use to the invention according to claim 1. Even though the description of the present case is examined, it does not appear that there is a special technical relationship between them.

Thus, the inventions according to claims 4 to 6 and the invention according to claim 1 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The inventions according to claims 4 to 6 each relates to a remedy for CODP, alveolar proteinosis or circulatory diseases containing an interleukin 18 inhibitor. However, use of such an inhibitor in treating circulatory diseases had been publicly known before the application date of the present case, as reported in the following document. Therefore, no single inventive concept can be found out among these three inventions.

Document: POMERANTZ, B.J. et al., Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta, Proc Natl.Acad.Sci.U S A., 2001, Vol.98, No.5, p.2871-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/00, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/02, 11/00, G01N33/15, 33/50, C12N15/09, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/00, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/02, 11/00, G01N33/15, 33/50, C12N15/09, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (SYN)	
BIOSIS (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	UEDA, S. <i>et al</i> , Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c, J Immunol, 1998, Vol.161, No.12, p.6689-95, 全文	1, 2
X	FARINA, A. R. <i>et al</i> , Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion, Eur J Biochem, 2001, Vol.268, No.2, p.405-13, 全文	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 05. 2005

国際調査報告の発送日

31.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

2938

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E X	JP 2005-60408 A(レドックスバイオサイエンス株式会社)2005.03.10 全文, 特に請求項 1-40(ファミリーなし)	3
X	SEN, C.K, Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants, Biochem Pharmacol, 1998, Vol.55, No.11, p.1747-58, 全文	3
Y	MACNEE, W. <i>et al</i> , Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease, Am J Respir Crit Care Med, 1999, Vol.160, No.5 Pt 2, p.S58-65, 全文	3
Y	JP 2001-510997 A(カロ バイオ アクチェブラーグ)2001.08.07, 全文, 特に請求項 1-40 & WO 98/32863 A2	3
Y	JP 63-230637 A(レプリゲン コーポレーション)1988.09.27 全文, 特に請求項 1-18 & EP 237189 A2	3
X	POMERANTZ, B.J. <i>et al</i> , Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Vol.98, No.5, p.2871-6, 全文	6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 III 欄

本願の請求の範囲 1 に係る発明は、「レドックス活性蛋白質～（略）を含むことを特等とするプロテアーゼ阻害剤」であるが、請求の範囲 4-6 に係る発明は、インターロイキン 18 阻害剤～（略）を含むことを特徴とする CDDP、肺胞蛋白症、または循環器疾患の治療剤であり、請求の範囲 1 に係る発明と有効成分及び用途のいずれも一致していない。また、本願明細書を見ても、両者の間に特別な技術的関係があるとも認められない。

したがって、請求の範囲 4-6 に係る発明は、請求の範囲 1 に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

また、請求の範囲 4-6 に係る発明は、いずれもインターロイキン 18 阻害剤を含む CDDP、肺胞蛋白症、または循環器疾患の治療剤であるが、下記文献にも記載のとおり、当該阻害剤を循環器疾患の治療に用いることは本願出願日前に公知であるので、それら 3 つの発明の間に単一の発明概念を認めることはできない。

文献：POMERANTZ, B. J. *et al*, Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Vol. 98, No. 5, p. 2871-6